

1

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 64-012257

(43)Date of publication of application : 17.01.1989

(51)Int. Cl.

G01N 27/30

G01N 27/46

(21)Application number : 62-168181

(71)Applicant : DAIKIN IND LTD

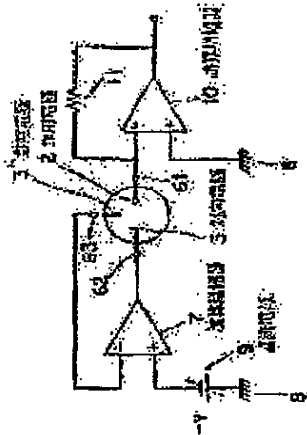
(22)Date of filing :

06.07.1987

(72)Inventor : NAGATA YASUHIRO

FUJIMURA HIDETAKA

### (54) BIOSENSOR



### (57)Abstract:

**PURPOSE:** To achieve a higher measuring accuracy of the density of an objective substance, by providing a reference electrode surrounding a majority part of a working electrode to upgrade a property of following a potential of a reference electrode with respect to a potential variation of an opposed electrode.

**CONSTITUTION:** The output terminal of an operational amplifier 7 in which a DC power source 9 is connected to a positive input terminal to give a bias of  $-V$  to an earth potential 8 is connected to an opposed electrode 3 while a negative input terminal is connected to a reference electrode 3' to enable the controlling of a potential of the electrode 3' following a potential variation of the electrode 3. In this case, as the electrode 3' surrounds the entire

circumference of a working electrode 2, it is under the quick effect of the potential variation caused by a current generated between the electrodes 2 and 3 to attain a better property of following the potential thereby achieving a higher measuring accuracy of the density of a substance as object.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

1/TUE 11/0

reference 2

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭64-12257

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和64年(1989)1月17日

G 01 N 27/30  
27/46J-7353-2G  
M-7353-2G

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑮ 発明の名称 バイオセンサ

⑯ 特 願 昭62-158181

⑰ 出 願 昭62(1987)7月6日

⑱ 発 明 者 永 田 保 広 滋賀県草津市岡本町字大谷1000番地の2 ダイキン工業株式会社滋賀製作所内

⑲ 発 明 者 藤 村 英 隆 滋賀県草津市岡本町字大谷1000番地の2 ダイキン工業株式会社滋賀製作所内

⑳ 出 願 人 ダイキン工業株式会社 大阪府大阪市北区中崎西2丁目4番12号 梅田センタービル

㉑ 代 理 人 弁理士 津 川 友 士

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

バ イ オ セ ン サ

## 2. 特許請求の範囲

1. 下地電極の表面に、生体活性物質を固定化した固定化酵素膜を設けることにより、酵素反応の結果に基いて下地電極により電気信号を生成し、生成電気信号に基いて対象物質の測定を行なうバイオセンサにおいて、下地電極が、作用電極、参照電極、および対向電極から構成されているとともに、参照電極、および対向電極がそれぞれ作用電極を包囲する状態で配置されており、しかも、参照電極が作用電極の外周の過半部を包囲する形状に形成されているとともに、対向電極の電位変動に対応するバイアス電位が供給されていることを特徴とするバイオセンサ。
2. 参照電極、および対向電極が、この順

に作用電極を包囲している上記特許請求の範囲第1項記載のバイオセンサ。

3. 対向電極、および参照電極が、この順に作用電極を包囲しているとともに、対向電極を白金或金膜で形成している上記特許請求の範囲第1項記載のバイオセンサ。
4. 参照電極が、作用電極を中心とする同心円状に形成されている上記特許請求の範囲第1項、または第2項に記載のバイオセンサ。
5. 下地電極が、酵素反応により生成される物質の量に対応する電気信号を生成するものである上記特許請求の範囲第1項から第4項の何れかに記載のバイオセンサ。
6. 下地電極が、酵素反応により消費される物質の量に対応する電気信号を生成するものである上記特許請求の範囲第1項から第4項の何れかに記載のバイオセンサ。

## 特開昭64-12257(2)

す。

### 3. 発明の詳細な説明 ＜産業上の利用分野＞

この発明はバイオセンサに関し、さらに詳細にいえば、生体活性物質を固定化した固定化生体膜を下地電極の上に設け、活性反応の結果に誘って下地電極において測定対象物質に対応する電気信号を生成するバイオセンサに関する。

### ＜従来の技術、および発明が解決しようとする問題点＞

従来から非常に豊富な有機化合物、蛋白質等を極めて高感度な、かつ選択的に検知することができるという特質に着目して、下地電極の表面に生体活性物質を固定してなるバイオセンサにより上記有機化合物、蛋白質等の測定を行なうための研究開発が行なわれている。

そして、上記バイオセンサを使用して対象物質の測定を行なう場合には、通常、対象物質の酸化、還元等を上記生体活性物質の存在下において行なわせ、生成物質、或は消失物質の量を測定するこ

とにより測定対象物質の濃度を測定するのであり、上記下地電極の具体的な構成としては、第8図に示す2電極式のものと、第9図、および第10図に示す3電極式のものとに大別される。

さらに詳細に説明すると、第8図に示す2電極式のものは、白金族金属等からなる作用電極(31)と、参照からなる対向電極(32)とを所定距離だけ隔てた状態で配置し、両電極間に存在する反応生成物質、或は反応消失物質の量に対応する電流信号を生成するようにしている。

したがって、得られる電流信号に基づいて対象物質の濃度を測定することができる。

しかし、このような構成のものにおいては、両電極間の電位を安定化させることが困難であり、一般時には、作用電極(31)に対する対向電極(32)の電位を十分に大きくすることにより、両電極間の電位を安定化する試みが行なわれているだけであるから、全体として大型化するとともに、一般的に貴金属で形成される対向電極が大きくなることに伴って全体としてコストアップを招いてし

まうという問題がある。

第9図、および第10図に示す3電極式のものは、作用電極(31)を挟んで対向電極(32)、および参照電極(33)を互に対称位置に設け、対向電極(32)と参照電極(33)との間に、電流電極(34)、および演算増幅器(35)により対向電極(32)の電位変動に対応するバイアス電圧を印加するようにしている。

したがって、対向電極(32)の面積をかなり大きくしなくても電位の安定性を高めることができ、ひいては、得られる電流信号に基づいてかなり正確な対象物質の濃度を測定することができる。

しかし、全ての条件下において対象物質の濃度を正確に測定することができるわけではなく、例えば、平衡電流の測定を除く、定常的な測定を行なう場合に限って対象物質の濃度を正確に測定することができるのである。逆に、電流変化率に基づいて対象物質の濃度を測定しようとする場合には、参照電極(33)の電位追従性が測定精度に大きな影響を及ぼすことになるのであるから、参照電極(33)と対向電極(32)との間において上記2電極

式のものと同様の関係を充足させることが必要になり、かえって参照電極(33)、および参照電極(33)に対するバイアス供給回路が必要になることにより、構成の複雑化が顕著になるという問題がある。この点についてさらに詳細に説明すると、上記バイオセンサを使用して対象物質の測定を行なう場合には、通常、対象物質の酸化、還元等を上記生体活性物質の存在下において行なわせ、生成物質、或は消失物質の量を測定することにより測定対象物質の濃度を測定するのであるから、測定可能な上限が、酸化、還元等を行なわせる物質、例えば酸素等の存在量により制限されることになってしまい、平衡電流に基づく測定を行なっても、高濃度の対象物質の濃度については、到底正確な測定結果を得ることができないことになってしまうという問題がある。そして、このような問題点を解消させるために、電流一次微分ピーク値に基づいて対象物質の濃度を測定することが考えられるのであるが、この場合には、参照電極(33)の追従性を高めなければ、正確な電流一次微分値を得る

## 特開昭64-12257(3)

ことができず、ひいては正確な対象物質の濃度を算出することができないのである。

## ＜発明の目的＞

この発明は上記の問題点に鑑みてなされたものであり、非平衡状態における電気信号に憑いて高い測定精度での対象物質の濃度を測定することができ、バイオセンサを提供することを目的としている。

## ＜問題点を解決するための手段＞

上記の目的を達成するための、この発明のバイオセンサは、下地電極が、作用電極、参照電極、および対向電極から構成されているとともに、参照電極、および対向電極がそれぞれ作用電極を包囲する状態で配置されており、しかも、参照電極が、作用電極の外周の過半数を包囲する形状に形成されているとともに、対向電極の電位変動に対応するバイアス電位が供給されているものである。

但し、上記参照電極、および対向電極が、この順に作用電極を包囲していることが好ましい。

また、上記対向電極、および参照電極が、この

順に作用電極を包囲しているとともに、対向電極を白金族金属で形成していることも好ましい。

そして、上記参照電極が、作用電極を中心とする同心円状に形成されていることが好ましい。

さらに、上記下地電極が、酵素反応により生成される物質の量に対応する電気信号を生成するものであってもよく、或は、上記下地電極が、酵素反応により消失される物質の量に対応する電気信号を生成するものであってもよい。

## ＜作用＞

以上の構成のバイオセンサであれば、測定対象物質が固定化酵素膜に吸着することにより、所定の反応が行なわれて特定の物質が生成され、或は消失される。この結果、下地電極の間に電気信号が生成され、外部に導かれる。

そして、この場合において、下地電極が、作用電極と、対向電極と、作用電極の過半数を包囲する参照電極とで構成されているのであるから、作用電極を基準として場合における、参照電極の電位の対向電極に対する追従性を高めることができ、

ひいては、作用電極と参照電極との間の電位を所定値に保持し続けることができる。

さらに詳細に説明すると、酵素反応により生成され、或は、消失される物質の流動性が著しく高い状態であれば、参照電極の形状に拘わらず、対向電極の電位変動に対する参照電極の電位の追従性を高めることができることになるのであるが、下地電極の表面における流動性は通常かなり悪いので、局部的にのみ参照電極が形成されている場合には、参照電極の電位の追従性が悪くなり、対象物質の濃度測定精度を低下させることになってしまう。ところが、この発明のバイオセンサにおいては、参照電極が、作用電極の過半数を包囲する形状であるため、下地電極表面における流動性が良好でなくても、即ち、部分的なばらつきが存在していても、対向電極の電位変動に対する参照電極の電位追従性を良好にすることができる。したがって、参照電極と作用電極との間の電位を一定に保持し、高精度に対象物質の濃度測定を行なうことができる。

そして、上記参照電極、および対向電極が、この順に作用電極を包囲している場合には、作用電極と対向電極との間に生成される電流の影響が迅速に参照電極に及ぼされ、参照電極の電位追従性が著しく向上する。

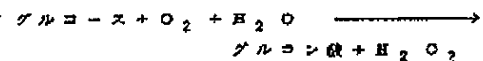
次に、上記対向電極、および参照電極が、この順に作用電極を包囲しているとともに、対向電極を白金族金属で形成している場合には、対向電極が良好な電極特性を発揮し、出力特性を安定化して、高精度に対象物質の濃度測定を行なうことができる。

また、上記参照電極が、作用電極を中心とする同心円状に形成されている場合には、作用電極と対向電極との間に生成される電流の影響が確実に参照電極に及ぼされ、参照電極の電位追従性が著しく向上する。

さらに、上記下地電極が、酵素反応により生成される物質の量に対応する電気信号を生成するものである場合にも、或は、上記下地電極が、酵素反応により消失される物質の量に対応する電気信

特開昭64-12257(4)

C O D



号を生成するものである場合にも、上記と同様の作用を達成することができる。

#### <実施例>

以下、実施例を示す添付図面によって詳細に説明する。

第1図はこの発明のバイオセンサの一実施例の構成を示す横断面図であり、非電極本体(1)の一部を凸面としているとともに、凸面において外部に露出する状態でP<sub>1</sub>からなる作用電極(2)、およびA<sub>2</sub>からなるリング状の参照電極(3)、対向電極(4)をこの順に設けている。そして、上記凸面を被う状態で、グルコースオキシゲナーゼ(以下、C O Dと略称する)を固定した固定化酵素膜(5)、およびセロハン等からなる拡散制限膜(6)を設けている。尚、上記非電極本体(1)の他側所定位置には、上記作用電極(2)、参照電極(3)、および対向電極(4)に対してそれぞれ接続された信号取出し端子(81)(82)(83)を設けている。

したがって、固定化酵素膜(5)において、

の酵素的反応が行われ、生成されるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の量に対応する電流が作用電極(2)と対向電極(4)との間に生成され、信号取出し端子(81)(83)を通して外部に取出されることになる。

第2図は第1図のバイオセンサに対するバイアス供給構成を示す回路図であり、信号取出し端子(81)を通して対向電極(4)に対して出力端子が接続された演算増幅器(7)の負入力端子を信号取出し端子(82)を通して参照電極(3)と接続しているとともに、正入力端子とアース(9)との間に逆バイアス用の直流電源(10)を接続している。そして、演算増幅器(7)の負入力端子を信号取出し端子(81)を通して作用電極(2)に接続しているとともに、正入力端子をアース(9)と接続しており、さらに、演算増幅器(7)の出力端子と負入力端子との間にフィードバック抵抗(11)を接続している。

上記の構成のバイオセンサの動作について、第

3図を参照しながら説明する。

作用電極(2)、参照電極(3)、および対向電極(4)は、そのままだアース(9)から導いた状態になっているので、各電極の電位は何ら定まった電位になっていないわけでは無いが、正入力端子に、アース(9)に対して-Vのバイアスを与えるべく直流電源(10)が接続された演算増幅器(7)の出力端子を対向電極(4)に接続するとともに、負入力端子を参照電極(3)に接続しているので、対向電極(4)の電位変動に追従させて参照電極(3)の電位を制御することができる。この場合において、参照電極(3)は、作用電極(2)の全周を包囲しているものであるから、作用電極(2)と対向電極(4)との間に生成される電流に起因する電位変動の影響を迅速に受けて、良好な電位追従性を達成することができる。

そして、作用電極(2)には、正入力端子をアース(9)に接続した演算増幅器(7)の負入力端子が接続されているので、作用電極(2)と参照電極(3)との間の電位差を、上記直流電源(10)の起電力Vと等しく保持し続けることができる(第3図中、A、Bを

照)。

さらに詳細に説明すると、作用電極(2)と対向電極(4)との間に生成される電位差の殆どは、第3図に示すように、作用電極(2)の界面近傍、および対向電極(4)の界面近傍に集中しており、残りの領域においては、非常に小さな電位変化が存在するだけである。

そして、対象物質の濃度を測定する場合に最も重要なのは、対向電極(4)の界面近傍の電位差ではなく、作用電極(2)の界面近傍の電位差である。さらに、対向電極(4)の界面近傍の電位差は決定的によって変動する可能性があるため、このような変動に拘わらず、作用電極(2)の界面近傍の電位差を一定に維持することによってはじめて対象物質の濃度に対応する正確な信号を取出すことができる。

尚、作用電極(2)の界面近傍における電位差は、対象物質の濃度に対応して変化するのであるから、変化を許容することによって正確な信号を取出すことができることになり、この点を考慮して、上記起電力Vを決定することが必要である。

## 特開昭64-12257(5)

この点に関して上記実施例においては、参照電極(3')と作用電極(2)との間の電位差を $V$ に設定することができ、しかも、対向電極(1)の表面近傍の電位差の変動に対して高い追従性で参照電極(3')と作用電極(2)との間の電位差を $V$ に保持し続けることができるので、液相電極(1)からの出力電圧が、対象物質の濃度に対応する正確な値になる。

第4図は上記の構成のバイオセンサによりグルコース濃度を測定した場合の電流値変化を示す図、第5図は電流一次微分値の変化を示す図であり、それぞれ実験が上記の実施例による測定データを示し、破線が従来例による測定データを示している。

上記測定データから明らかなように、従来例と比較して上記実施例の場合には、電流値変化の追従性を向上させることができ、したがって、電流一次微分値を、対象物質濃度に対応する値とすることができる。

第6図はバイオセンサの他の実施例を示す平面図であり、上記実施例と異なる点は、参照電極

(3')と対向電極(2)との相対位置関係を逆に設定した点のみである。

したがって、この実施例の場合にも、参照電極(3')と作用電極(2)との間の電位差を $V$ に保持し続けることにより、対象物質の濃度に対応するかなり正確な電圧を得ることができる。

以上の説明から明らかなように、第1図の実施例の場合にも、第6図の実施例の場合にも、従来例の場合と比較して、対象物質の濃度に対応するかなり正確な電圧を得ることができるのであるが、各実施例の場合に同程度に正確な電圧を得ることができるわけではなく、次段に示すように、第1図の実施例の方が、より正確な電圧を得ることができる。また、参照電極(3')の電位の追従性を向上させることができることに伴って、ダイナミックレンジを拡大することもできる。

表 1

(グルコース濃度が150mg/dlの場合)

	第1図の場合	第6図の場合
出 力 (nA/s)	64.5	60.0
	65.4	62.9
	64.8	63.8
	63.7	61.7
	64.2	61.3
平 均	64.52	61.94
CV (%)	0.99	2.37

表 2

(グルコース濃度が300mg/dlの場合)

	第1図の場合	第6図の場合
出 力 (nA/s)	130.9	123.3
	128.5	121.0
	129.7	124.0
	127.7	121.7
	126.0	119.5
平 均	128.44	121.8
CV (%)	1.32	1.62

上記何れの実施例においても、対向電極(1)をAで形成しているが、対向電極(1)をPで形成することが可能である。

このように、対向電極(1)をPで形成した場合には、電極のリフレッシュを行なった後、かなり長時間にわたって出力低下が観察されなかったのであり、対向電極(1)をAで形成した場合にリフレッシュ後から出力低下が観察されたのであるから、対向電極(1)としての電極特性はP電極の方が優れていることが分る。但し、P電極は正極であるから、第6図に示す構成において対向電極(1)をPで形成する方が好ましい。

第7図は第6図の構成を採用するとともに、対向電極(1)をAで形成した場合、およびPで形成した場合におけるリフレッシュ後の出力変化を示す図であり、対向電極(1)をPで形成した場合には出力低下が殆ど生じなかった(図中実験参照)のに対して、対向電極(1)をAで形成した場合には、リフレッシュ後5分経過した時点で約10%の出力低下が生じ(図中実験参照)であり、対

特開2004-12257(6)

向電極(5)をP<sub>+</sub>で形成することが好ましいことが分る。

尚、この発明は上記の実施例に限定されるものではなく、例えば参照電極を、リングの一部を切除した如き形状とすること、楕円形、方形等適宜形状とすることが可能である他、参照電極の下層中心と作用電極の中心とを互にずらせることが可能であり、しかも、グルコース類以外の対象物質の検出、例えば、尿酸濃度等の測定、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>以外の反応生成物質、或は反応阻害物質の濃度に基づく濃度の測定に適用することが可能である他、この発明の要旨を脱しない範囲内において種々の設計変更を施すことが可能である。

#### ＜発明の効果＞

以上のようにこの発明は、作用電極の過半部を包囲する参照電極を設けているので、対向電極の電位変動に対する参照電極の電位の追従性を向上させることができ、ひいては、対象物質の濃度の測定精度を向上させることができるとともに、ダイナミックレンジを拡大することができるという

特有の効果を生ずる。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図はこの発明のバイオセンサの一実施例の構成を示す縦断面図、

第2図は第1図のバイオセンサに於けるバイアス供給構成を示す回路図、

第3図はバイオセンサの動作を説明する図、

第4図は第1図のバイオセンサによりグルコース濃度を測定した場合の電流値変化を示す図、

第5図は電流一次微分値の変化を示す図、

第6図はバイオセンサの他の実施例を示す平面図、

第7図は第6図の構成のバイオセンサにおいて対向電極をA<sub>g</sub>、P<sub>1</sub>でそれぞれ形成した場合の出力変化を示す図、

第8図、および第9図はそれぞれバイオセンサの従来例を示す縦断面図、

第10図は第9図の従来例の斜視図。

(2)…中心電極、(3)…対向電極、

(5')…参照電極、(4)…酸化触媒膜、

(7)…抗萃増幅器、(9)…直流電源

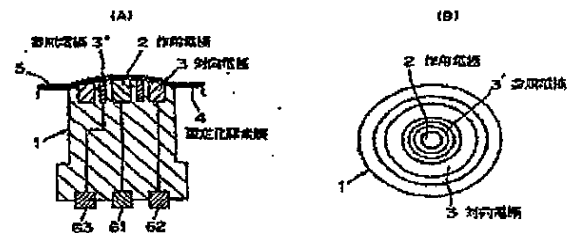
特許出願人 グイキン工業株式会社

代理人 弁頭士 島 井 弘 昭

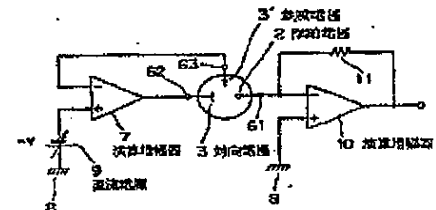
(ほか3名)



第 1 図



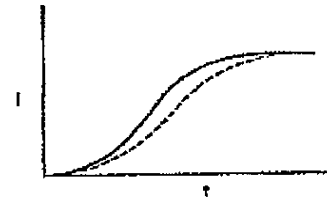
第 2 図



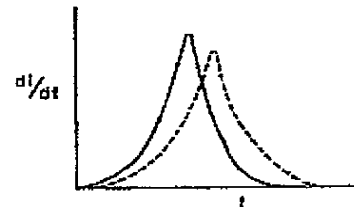


特開昭64-12257(7)

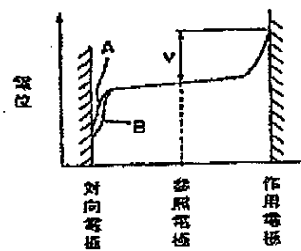
第 4 図



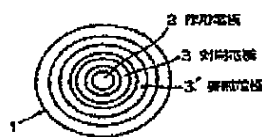
第 5 図



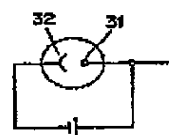
第 3 図



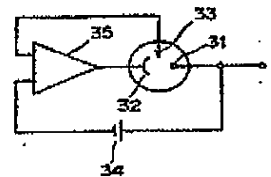
第 6 図



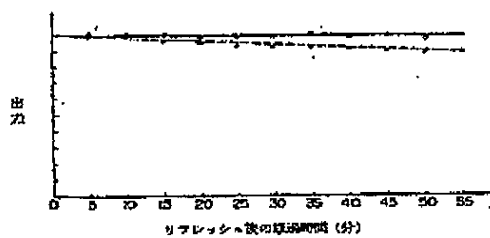
第 8 図



第 9 図



第 7 図



第 10 図

